

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390102

研究課題名（和文）アテローム血栓症の病態解明に関する病理学的研究

研究課題名（英文）Pathogenesis of atherothrombosis

研究代表者

浅田 祐士郎（ASADA YUJIRO）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70202588

研究成果の概要（和文）：アテローム血栓症は動脈硬化性プラークの破綻に伴う閉塞性血栓の形成により発症するが、血栓の形成の詳細はまだ明らかにされていない。本研究では、アテローム血栓症患者の病理組織標本、動物モデルおよび血流フローチャンバーを用いて、血栓形成機構を検討した。その結果、プラーク破綻部の血栓形成には、流血中の凝固活性よりも、プラーク内の凝固活性がより強く関与し、プラーク内の催炎症分子群が凝固活性の亢進に重要であること。また破綻部近傍の血流変動は、プラーク破綻と血栓の増大を惹起促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Thrombus formation on a disrupted atherosclerotic plaque is the major cause that leads to the onset of cardiovascular events. However, the detail mechanisms of thrombogenesis and thrombus propagation have been remained unclear. The issue was investigated using human pathological samples, novel established animal model of atherothrombosis, and flow chamber system. The results showed that thrombus formation was enhanced by the thrombogenicity of exposed plaque constituents rather than systemic thrombogenicity. And blood flow alteration greatly promoted thrombus propagation, and also induced erosive injury of plaques. Taken together, a combination of these factors could induce the onset of cardiovascular events.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：アテローム血栓症、血小板、凝固線溶系、炎症性サイトカイン、血流解析

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞に代表されるアテローム血栓症は、動脈硬化性プラークが破綻し、血栓が血管内腔を塞ぐことで発症する。この疾患群は、日本人の死因の約3割を占め、患者

数と医療費は増加の一途を示しており、病態解明と有効な予防・治療法の確立は医療経済的な観点からも急務の課題となっている。

プラーク破綻は、脂質コアを被う線維性被膜が、浸潤したマクロファージにより菲薄化

され発生する、との認識から、研究のターゲットはマクロファージ機能と細胞外マトリックスの分解機構に向けられている。しかし、剖検症例の観察から、プラーク破綻の30～40%は脂質コアに乏しく平滑筋細胞に富むプラークに起こっていること、プラーク破綻部の血栓がすべて血管内腔を塞ぐような大きな血栓ではなく、無症候性のプラーク破綻が少なくないことが明らかになっている。したがって、アテローム血栓症の発症病態の解明には、プラーク破綻の機序に加えて、血栓形成能の評価を含めた検討が重要と考えられる。

研究代表者はこれまでに、虚血性心疾患患者のプラーク破綻の病理所見と臨床データの対比を進め、プラーク破綻では酸化ストレスと炎症性サイトカインを介したマクロファージと平滑筋細胞の相互作用が重要で、血栓形成には血小板より凝固系が強く関与していることを明らかにしてきた。一方、プラークの組織像が類似したものであっても、破綻部に形成される血栓は、極めて小さな無症候性プラーク破綻から、内腔を閉塞する大きなものまでそのサイズは様々であり、その頻度は前者が極めて高いことを見出している。これらの所見は、アテローム血栓症の発症機序の解明には、プラーク破綻後の血栓の形成と増大機構の解明が必須であることを示唆している。

2. 研究の目的

プラーク破綻後の血栓の形成と増大を促進する機構について、人体病理・分子病理の立場から解析し、アテローム血栓症の発症病態の機序を解明し、発症予測マーカを探るとともに、新たな予防・治療法への臨床応用への展開を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 剖検症例を用いて、無症候性のプラーク破綻の頻度と、その血栓の病理学的特徴及びプラーク破綻のタイプを明らかにする。
- 2) アテローム血栓症患者の血管内治療時に採取されたプラークおよび血栓の病理標本を用いて、プラーク破綻ならびに血栓形成を促進する因子（炎症性サイトカイン、組織因子を含めた凝固因子群、CD39、ADAMTS13 など）の局在と活性の差異を明らかにする。
- 3) 冠動脈ステント挿入後の血栓症(ステント血栓症)について、血栓の組成を病理組織学的に解析する。
- 4) 催炎症因子であるCRP (C 反応性蛋白) を高発現させたトランスジェニック (Tg) 家兎を用いて、CRP のプラーク形成ならびに血栓形成への作用を検討する。
- 5) 血流下における血栓形成の機序について、動物モデルと血液フローチャンバーを用

いて、血栓形成過程をリアルタイムで可視化し、血栓の形成と増大に関する因子種を分子レベルで解析する。

- 6) コンピュータシミュレーションによりプラークと血流を3Dで再構成し、プラーク破綻と血栓形成における血流と壁に加わる流体力学的作用を解析する。
- 7) プラーク破綻部の血管収縮は、血栓形成の増大および血管閉塞を促す。この血管収縮における血栓関連因子の関与を明らかにする。

4. 研究成果

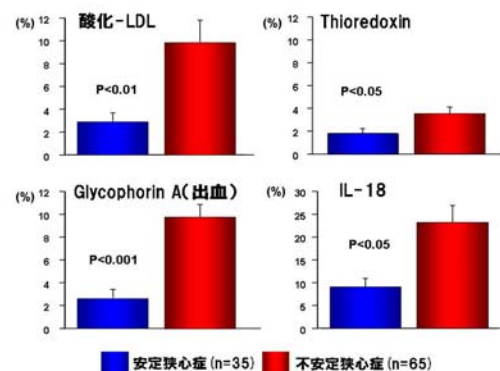
- (1) **無症候性のプラーク破綻の頻度**：非冠動脈疾患の剖検症例 100 例を用いて、冠動脈の連続組織標本を作成し、詳細に観察した。その結果、

非冠疾患死症例において、血栓を伴う無症候性のプラーク破綻が約 10% の症例に発症していること、プラーク破綻の約 7 割はびらん型で、血小板優位の血栓であることを明らかにした。

この結果、生体ではプラーク破綻が稀な現象ではなく、形成されて血栓の増大がイベント発症に重要であることを示す結果である。

- (2) **アテローム血栓症患者のプラークの検討**：心筋梗塞・不安定狭心症、安定狭心症患者の冠動脈アテレクトミー標本を病理組織学的に検討し、CRP (C 反応性蛋白) をはじめとした炎症関連因子種とイベント発症との関連性を検討した。併せてプラーク内と血液の凝固活性を測定し、血栓形成能との関連を解析した。その結果、

心筋梗塞・不安定狭心症患者のプラークでは、CRP, PTX3, IL-6, -18, IFN- γ などの催炎症性サイトカインに加えて、IL-10 などの炎症抑制サイトカイン群が有意に増加していること。またプラーク内出血とこれらに伴う酸化ストレスの増強がプラーク破綻に強く関与することが示唆された。(下図)



プラーク破綻後の血栓形成は、血中の凝固能よりもプラーク内の凝固活性により強く依存し、特にトロンビン生成能が中心的役割を果たすことを明らかにした。

また催炎症性サイトカインである PTX3 が、血小板の凝集抑制作用を有することも明らかにした。

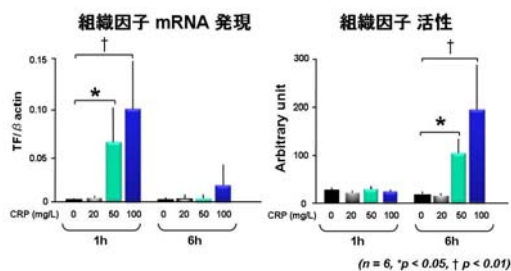
- (3) **ステント血栓症の検討**：薬剤溶出性ステント装着後のステント血栓症の血栓の組成について、吸引血栓標本 10 症例を用いて、病理組織学的検討を行った。その結果、血栓は、血小板とともに多量のフィブリンから成っており、心筋梗塞症例と同様の血栓組成であること。

また血栓形成には CRP, PTX3, IL-6, -10 などの炎症性サイトカイン群の発現に加えて血栓表層には CD34 陽性細胞が多数観察された。

これらの結果は、ステント血栓症において、炎症性機序加えて流血中の前駆細胞の関与も示唆された。

- (4) **CRP による血栓形成への作用**：血中 CRP 濃度は心血管イベント発症の予測因子とされるが、アテローム血栓症の発生病態への関与は不明である。前述のごとく、本研究においてもアテローム血栓症患者のプラークには大量の CRP 蛋白の局在が認められた。そこでヒト型 CRP を肝臓で高発現させたトランスジェニック (Tg) 家兎を用いて、CRP のプラーク形成ならびに血栓形成への作用を検討した。その結果、血中 CRP 濃度が 50mg/L 以上の Tg 家兎においても、形成されるプラークのサイズは non-Tg 家兎に比べて有意な差異は認められなかった。一方、血栓形成は Tg 家兎において有意に促進された。この機序について、同動物モデルと培養細胞を用いて解析し、プラーク内に沈着した高濃度の CRP が、血管平滑筋細胞の組織因子発現・活性を亢進し、血栓形成に促進的に働くことを明らかにした。(下図)

ヒトCRPは家兎培養血管平滑筋細胞の組織因子発現/活性を増大する



- (5) **血栓の成長に及ぼす VW 因子-ADAMTS13 の作用**：動脈血栓の形成・成長において血小板がその主役を演じるが、血小板の凝集は von Willebrand (VW) 因子の分子サイズに依存し、高分子量ほど凝集能が高い。ADAMTS13 は VW 因子を切断し分子サイズを調節する酵素である。アテローム血栓症の発生における ADAMTS13 の作用を検討した。その結果、

血液フローチャンバーの解析において、血小板の粘着・凝集は高ズリ応力下で増大し、20%の ADAMTS13 活性の低下により、血栓形成が有意に促進された。

動物モデルを用いても、ADAMTS13 活性阻害抗体の投与により高分子の VW 因子が増大し、血栓形成が著明に増大することが示された。

これらの結果は、ADAMTS13 活性の多寡が新たなアテローム血栓症の予測因子となる可能性を示唆している。

- (6) **血流変動によるプラーク破綻と血栓形成**：プラーク破綻の機序の一つに血流の変化が注視されているが、その機序は不明である。アテローム血栓症の動物モデルを用いて、血流変動に伴う、プラーク壁ならびに血栓形成への作用について検討した。その結果、

血管狭窄に伴う急激な血流変動によって、狭窄下流域のプラークには、びらん性のプラーク破綻が誘発された。この機序としては、血流作用による物理的な傷害に加えて、プラーク内細胞のアポトーシスに依ることが明らかとなった。

びらん領域は、経時的に広がり、同部には血小板とフィブリンからなる壁在血栓が形成された。さらに時間経過により閉塞性血栓が形成されることも確認された。一方、健全な動脈では、同様の血流環境においてもフィブリン形成や閉塞性血栓は認められなかった。以上の結果より、プラーク内の凝固活性が血栓の増大に強く関与ことが示唆された。

さらに血流コンピュータシミュレーションにより、壁に作用する血行動態の因子を解析し、ズリ応力の振動変化に加えて、プラークに作用する乱流強度が、プラークびらんの発生に関連してことを明らかにした。

- (7) **プラーク破綻に伴う血管収縮**：プラーク破綻後の血栓からは、セロトニン、トロンビン、ADP/ATP などの血管作動物質が放出され、血栓形成の増強や血管収縮に作用

し、さらなる血栓の増大に関与すると考えられている。アテローム血栓症の動物モデルを用いて、これら血管作動分子による血栓形成の増強と血管収縮反応を検討した。その結果、

プラークの破綻した血管において、セロトニンはトロンピンや ADP/ATP に比して、有意に強い血栓形成作用を有しており、血栓性閉塞に強く関与することが示された。

またセロトニンはプラークを有する動脈に対して、極めて強い血管収縮作用を示し、この機序はプラーク自体の収縮作用に加えて、プラーク下層の中膜平滑筋細胞の過収縮によることを明らかにした。(下図)

さらにこれらの作用が、血小板および

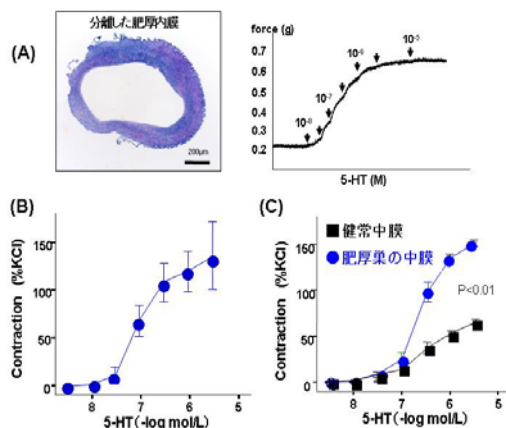


図 セロトニン (5-HT) による家兔大腿動脈の肥厚内膜、中膜の収縮能 (A)分離した肥厚内膜(左)は5-HTに収縮反応(右)を示す。(B)分離した肥厚内膜の5-HTに対する収縮反応 (C)肥厚内膜下の中膜は、健常動脈の中膜に比して5-HTに対する有意な過収縮反応を示す。

血管平滑筋細胞のセロトニン受容体 5-HT_{2A} を介することを証明し、5-HT_{2A} 受容体の選択的阻害薬の前投与により、プラーク破綻後の閉塞性血栓形成ならびに血管収縮を予防できることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, Kitajima S, Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen YE, Fan J, Asada Y. Human C -reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. J Thromb Haemost. 2011;9:201-208. (査読：有)

Sumi T, Yamashita A, Matsuda S, Goto S, Nishihira K, Furukoji E, Sugimura H, Kawahara H, Imamura T, Kitamura K, Tamura S, Asada Y. Disturbed blood flow induces erosive injury to smooth muscle cell-rich neointima and promotes thrombus formation in rabbit femoral artery. J Thromb Haemost. 2010;8:1394-1402. (査読：有)

Yamashita A, Matsuda S, Matsumoto T, Moriguchi-Goto S, Takahashi M, Sugita C, Sumi T, Imamura T, Shima M, Kitamura K, Asada Y. Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits. Atherosclerosis. 2009;206:418-426. (査読：有)

Moriguchi-Goto S, Yamashita A, Tamura N, Soejima K, Takahashi M, Nakagaki T, Goto S, Asada Y. ADAMTS-13 attenuates thrombus formation on type I collagen surface and disrupted plaques under flow conditions. Atherosclerosis. 2009;203:409-416. (査読：有)

Nishihira K, Yamashita A, Tanaka N, Moriguchi-Goto S, Imamura T, Ishida T, Kawashima S, Yamamoto R, Kitamura K, Asada Y. Serotonin induces vasoconstriction of smooth muscle cell-rich neointima through 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor in rabbit femoral arteries. J Thromb Haemost 2008;6:1207-1214. (査読：有)

Nishihira K, Yamashita A, Imamura T, Hatakeyama K, Sato Y, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H, Kitamura K, Asada Y. Thioredoxin in coronary culprit lesions: possible relationship to oxidative stress and intraplaque hemorrhage. Atherosclerosis. 2008;201:360-367. (査読：有)

〔学会発表〕(計 23 件)

Asada Y. Thrombus formation on disrupted atheromatous plaques. The 4th Oriental Congress of Cardiology (2010-5-28) Shanghai

Sameshima N, Yamashita A, Goto S, Asada Y. Animal model of atherothrombosis and computational fluid dynamics simulation show an association between turbulent blood flow and thrombus formation. The 2nd Bio - Super - Computing Symposium (2010-3-19) 東京

畠山金太、浅田祐士郎：動脈硬化薬の進展

と血栓症の発症におけるマクロファージの関与、第32回日本血栓止血学会学術集会(2009-6-4)北九州

Nishihira K, Imamura T, Nakama T, Mine D, Shimomura M, Nomura K, Kuriyama N, Matsuyama A, Ishikawa T, Shibata Y, Kitamura K, Asada Y. Serotonin induces vasoconstriction of smooth muscle cell-rich neointima through 5-hydroxytryptamine 2A receptor in rabbit femoral arteries. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2009-3-21) 大阪

Asada Y, Yamashita A, Sumi T. Disturbed blood flow induces erosive injury of smooth muscle cell-rich intima and promotes thrombus formation. The 5th Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis Conference (2008-9-19) Singapore

〔図書〕(計7件)

Yamashita A, Asada Y. Springer, Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis, 2008, pp614-624.

佐藤勇一郎、浅田祐士郎：永井書店、最新 狭心症診療の実際、2009, pp19-24.

浅田祐士郎：医薬ジャーナル社、抗血栓薬の最前線 基礎と臨床 2011, pp18-34.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ペントラキシンまたはペントラキシン3変異体を含む、血小板凝集抑制剤、血栓形成抑制剤および循環器疾患の治療薬

発明者：浅田祐士郎、畠山金太、今村卓郎、後藤清香、児玉龍彦、相良三奈

権利者：国立大学法人宮崎大学、国立大学法人東京大学、株式会社ペルセウス

種類：特許

番号：特願 2008 - 255988

出願年月日：2008年10月1日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/patho1/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 祐士郎 (ASADA YUJIRO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70202588

(2) 研究分担者

佐藤 勇一郎 (SATO YUICHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90347055

山下 篤 (YAMASHITA ATSUSHI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90372797

今村 卓郎 (IMAMURA TAKUROH)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：60203329

(3) 連携研究者

研究者番号：